

# 肿瘤坏死因子和血管内皮生长因子在大肠癌中的表达及意义

宋印利<sup>1</sup> 孙淑娟<sup>2</sup>

(1 哈尔滨医科大学大庆校区 1633192 哈尔滨医科大学附属第五医院 163319)

**摘要** 目的:探讨肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ )、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在大肠癌中的表达及其与肿瘤病理分级、Dukes 分期的关系。方法:大肠癌组织 50 例,大肠腺瘤 20 例,正常组织 20 例,采用免疫组化二步法对标本切片进行染色。结果:TNF $\alpha$ 、VEGF 在癌组织中表达明显高于正常组织和腺瘤,三者之间差异显著( $P < 0.05$ )。VEGF 表达与病理分级、Dukes 分期呈正相关性,而 TNF $\alpha$  表达则相反( $P < 0.01$ )。TNF $\alpha$  与 VEGF 在癌组织中的表达呈负相关。( $P < 0.01$ )。结论:TNF $\alpha$  及 VEGF 的检测可作为大肠癌预后估计的客观指标。

**关键词:** 大肠癌; TNF $\alpha$ ; VEGF; 免疫组化

**中图分类号:** R735.3 **文献标识码:** A

## Clinicopathological significance of TNF $\alpha$ and VEGF expression in colorectal cancer

SONG Yin - li<sup>1</sup>, SUN Shu - juan

(1 Hrbn medical university daqing branch

2 The fifth hospital affiliated to Hrbn medical university)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the expression of TNF $\alpha$  and VEGF antigen in the colorectal cancer and their relationship with pathological stage, dukes stage and prognosis of colorectal cancer. **Methods:** Immunohistochemical staining two - step method are used to detect TNF $\alpha$ , VEGF antigen expression in normal mucous tissue(20 cases), in adenoma tissue(20cases) and in colorectal cancer tissue(50 cases). **Result:** TNF $\alpha$  and VEGF antigen level were significantly different in the colorectal cancer tissue, in the adenoma tissue and in the normal mucous tissue( $P < 0.01$ ). The expression of TNF $\alpha$  and VEGF were significantly higher in the colorectal cancer than that of adenoma tissue and normal mucous tissue. TNF $\alpha$  and VEGF expression were closely correlated with the pathological stage, Dukes stage( $P < 0.05$ ). It is negative correlation between TNF $\alpha$  and VEGF in the colorectal cancer tissue. **Conclusion:** TNF $\alpha$  and VEGF are both associated with the growth of the colorectal cancer. TNF $\alpha$  and VEGF are objective predictable indicator for prognosis of colorectal cancer.

**Key word:** Colorectal cancer; TNF $\alpha$ ; VEGF; Immunohistochemistry

大肠癌是人类发病率最高的恶性肿瘤之一,由于经济发展,人民生活水平的提高以及饮食结构的改变,大肠癌的发病率一直呈上升趋势,为人们所关注。实体瘤的生长离不开新生血管,在血管生成过程中,有众多因素参与调控,其中 TNF $\alpha$  和 VEGF 在肿瘤血管的调控中起着非常重要的作用。目前国内外对很多专家对 TNF $\alpha$  和 VEGF 在胃癌中的表达研究较多<sup>[1-3]</sup>,而对其在大肠癌中表达的研究并不多,尚需进一步证实,因此作者采用免疫组化方法研究了大肠癌中 TNF $\alpha$  和 VEGF 的表达,以探讨 TNF $\alpha$ 、VEGF 与大肠癌的关系及二者在大肠癌中表达的相关性。

## 1 材料与方法:

### 1.1 标本来源

本实验材料选自哈尔滨医科大学附属第二临床学院 2002 年以前大肠癌根治术病例存档蜡块 50 例,均具有完整临床病理资料。腺瘤组织 20 例,阴性切片 20 例作为对照组,其中男性 28 例,女性 22 例,平均年龄 54.7 岁,高中低分化癌分别为 22 例、20 例、8 例。按照 Dukes 分期, A 期 25 例、B 期 13 例、C 期 8 例、D 期 4 例,每例组织蜡块重新切片,HE 染色,确保对照组为阴性,校对病理资料并选取最佳标本。

### 1.2 实验标本的准备

载玻片清洗干净后,放入 70% 乙醇 - 1% 盐酸浸泡 48 小时,蒸馏水冲洗,烤箱内烘干,10% 多聚赖氨酸(Poly - L - Lysin)涂片后,风干过夜。对蜡块进行连续切片 5 张,每张厚 4 $\mu$ m,放入 55C 烤箱中烤 8 小时。

### 1.3 免疫组化方法

免疫组化仪器和试剂:医用微波炉、恒温箱、冰箱、显微镜;抗体购自北京中山公司;显色系统:DAB 工作液 3mg 溶于 3ml 蒸馏水中,使用时配制。免疫组化步骤按试剂盒说明进行。阳性结果的判定标准:每组实验都设有阳性和阴性对照。TNF $\alpha$ 、VEGF 均在细胞浆中表达,呈现棕黄色颗粒。统计学分析:使用 SPSS 统计软件进行分类资料的相关性分析及  $\chi^2$  检验。

## 2 结果:

### 2.1 TNF $\alpha$ 在大肠癌中的表达

**2.1.1 TNF $\alpha$  在不同组织中的表达:** 20 例正常粘膜中 TNF $\alpha$  仅有 2 例阳性;20 例腺瘤组织中, TNF $\alpha$  有 15 例表达;50 例癌组织中 TNF $\alpha$  阳性表达 28 例。

作者简介:宋印利,男,(1967 -),副教授,病理学专业

(收稿日期:2006 - 05 - 26 接受日期:2006 - 06 - 30)

表1 TNF $\alpha$  蛋白在正常粘膜、腺瘤、癌组织中的表达

TNF antigen expression in normal mucous ,in adenoma and in colorectal cancer tissue

| 不同组织 | TNF $\alpha$ |     | 合计 |
|------|--------------|-----|----|
|      | 阳性数          | 阴性数 |    |
| 正常组织 | 2            | 18  | 20 |
| 腺瘤   | 15           | 5   | 20 |
| 癌组织  | 28           | 22  | 50 |
| 合计   | 45           | 45  | 90 |

$$\chi^2 = 18.52 \quad P < 0.01$$

如表1所示:TNF $\alpha$  蛋白在癌组织中表达明显高于正常组织和腺瘤组织,三者之间存在显著差异  $P < 0.01$ 。

2.1.2 TNF $\alpha$  表达与肿瘤分化程度的关系:如表2所示:TNF $\alpha$  蛋白在高、中、低不同分化程度的癌组织中表达分别为 17/22、9/20、2/8。随着肿瘤分化程度的降低 TNF $\alpha$  表达也降低,三者之间存在显著差异。  $P < 0.05$ 。

表2 TNF $\alpha$  表达与肿瘤分化程度的关系

The relationship between TNF expression with pathological stage of colorectal cancer

| 分化程度 | TNF $\alpha$ |     | 合计 |
|------|--------------|-----|----|
|      | 阳性数          | 阴性数 |    |
| 高分化  | 17           | 5   | 22 |
| 中分化  | 9            | 11  | 20 |
| 低分化  | 2            | 6   | 8  |
| 合计   | 28           | 22  | 50 |

$$\chi^2 = 8.14 \quad P < 0.05$$

2.1.3 TNF $\alpha$  表达与大肠癌 Dukes 分期的关系:TNF $\alpha$  在不同肿瘤分期中表达不同,各期之间存在显著差异  $P < 0.01$ 。TNF $\alpha$  蛋白在临床 A + B 期的表达为 25/38, C + D 期为 2/12,二者之间存在更显著差异  $P < 0.01$ 。

表3 TNF $\alpha$  表达与大肠癌 Dukes 分期的关系

The relationship between TNF expression with dukes stage of colorectal cancer

| Dukes 分期 | TNF $\alpha$ |     | 合计 |
|----------|--------------|-----|----|
|          | 阳性数          | 阴性数 |    |
| A        | 19           | 6   | 25 |
| B        | 7            | 6   | 13 |
| C        | 1            | 7   | 8  |
| D        | 1            | 3   | 4  |
| 合计       | 28           | 22  | 50 |

$$\chi^2 = 11.77 \quad P < 0.01 \quad \text{将 A + B 与 C + D 比较, 结果为 } 13.45, P < 0.01$$

## 2.2 VEGF 在大肠癌中的表达

2.2.1 VEGF 在不同组织中的表达,20 例正常粘膜组织中 VEGF 有 1 例表达,20 例腺瘤组织中 VEGF 有 4 例表达,50 例癌组织中 VEGF 阳性表达 29 例。

表4 VEGF 蛋白在正常粘膜、腺瘤、癌组织中的表达

VEGF antigen expression in normal mucous , in adenoma and in colorectal cancer tissue

| 不同组织 | VEGF |     | 合计 |
|------|------|-----|----|
|      | 阳性数  | 阴性数 |    |
| 正常组织 | 1    | 19  | 20 |
| 腺瘤   | 4    | 16  | 20 |
| 腺癌   | 29   | 21  | 50 |
| 合计   | 34   | 56  | 90 |

$$\chi^2 = 20.53 \quad P < 0.01$$

VEGF 的表达在正常粘膜、腺瘤、癌组织中的表达存在显著差异  $P < 0.01$ 。

2.2.2 VEGF 表达与肿瘤分化程度的关系:VEGF 的表达随分化程度的降低而升高,分别为 9/22、13/20、7/8。三者之间存在显著差异,  $P < 0.05$ 。

表5 VEGF 表达与肿瘤分化程度的关系

The relationship between VEGF expression with pathological stage of colorectal cancer

| 分化程度 | VEGF |     | 合计 |
|------|------|-----|----|
|      | 阳性数  | 阴性数 |    |
| 高分化  | 9    | 13  | 22 |
| 中分化  | 13   | 7   | 20 |
| 低分化  | 7    | 1   | 8  |
| 合计   | 29   | 21  | 50 |

$$\chi^2 = 7.34 \quad P < 0.05$$

2.2.3 VEGF 表达与大肠癌 Dukes 分期的关系:VEGF 的表达随着分期增加而增强,各期之间存在显著差异  $P < 0.05$ ,如果将 A + B 期和 C + D 期合并,则 A + B 期为 18/38,而 C + D 期为 11/12,二者之间存在更显著差异。

表6 VEGF 表达与大肠癌 Dukes 分期的关系

The relationship between VEGF expression with dukes stage of colorectal cancer

| Dukes 分期 | VEGF |     | 合计 |
|----------|------|-----|----|
|          | 阳性数  | 阴性数 |    |
| A        | 9    | 16  | 25 |
| B        | 9    | 4   | 13 |
| C        | 7    | 1   | 8  |
| D        | 4    | 0   | 4  |
| 合计       | 29   | 21  | 50 |

$$\chi^2 = 11.39 \quad P < 0.01, \text{ 将 A + B 与 C + D 比较结果 } \chi^2 = 7.35 \quad P < 0.01$$

## 2.3 TNF $\alpha$ 与 VEGF 的相关性分析

表7 TNF $\alpha$  与 VEGF 的相互关系

The relationship between TNF with VEGF

| VEGF | TNF $\alpha$ |     | 合计 |
|------|--------------|-----|----|
|      | 阳性数          | 阴性数 |    |
| (+)  | 7            | 21  | 28 |
| (-)  | 20           | 7   | 27 |
| 合计   | 27           | 28  | 55 |

$$\chi^2 = 13.25 \quad P < 0.01$$

结果显示:两者之间检测结果呈负相关。

## 3 讨论:

### 3.1 TNF $\alpha$ 在大肠癌中的表达

文献报道,TNF $\alpha$  蛋白染色阳性标记在细胞浆中及细胞膜上。在正常组织中仅粘膜表面有棕黄色颗粒沉着,腺瘤组织表达亦很少。本实验结果与此相符,在正常组织中仅有 2 例表达了阳性,腺瘤有 15 例表达,而癌组织中有 28 例表达,明显高于腺瘤和正常组织,三者之间存在显著差异 ( $P < 0.01$ ),这表明癌组织能通过自分泌方式产生 TNF。Vollands 等在研究直肠癌和卵巢癌组织活检时,通过原位杂交方法检测出肿瘤细胞可产生自分泌 TNF $\alpha$ ,认为自分泌的 TNF 可促进肿瘤生长,并可直接促进肿瘤浸润<sup>[6]</sup>。

### 3.2 TNF $\alpha$ 在大肠癌中表达与分化程度的关系

本研究发现 TNF $\alpha$  表达与大肠癌的分化程度有关,在不同

分化程度的癌组织中高、中、低分化癌的 TNF $\alpha$  的表达率分别为 77.2%、45%、25%，三者之间差异显著( $P < 0.05$ )，有统计学意义。

### 3.3 TNF $\alpha$ 在大肠癌中表达与大肠癌病理分期的关系

本研究发现 TNF $\alpha$  表达与 Dukes 分期有关，A、B、C、D 期 TNF $\alpha$  的表达率分别为 76%、53.8%、12.5%、25%。可见 A、B 期 TNF $\alpha$  的表达明显高于 C、D 期，A + B 期合并，C + D 期合并，则两组间差异显著( $P < 0.01$ )。

### 3.4 VEGF 蛋白在大肠癌中的表达情况

本研究用免疫组化方法检测大肠癌中 VEGF 的表达，20 例正常组织中 VEGF 有 1 例表达，20 例腺瘤组织中 VEGF 有 4 例表达，而 50 例大肠癌标本中有 29 例(58%)表达明显高于腺瘤和正常组织，三者之间差异显著( $P < 0.01$ )。Chen CA 等应用酶免疫分析法测定肿瘤细胞质内的 VEGF 含量；Guidi AJ 等用原位杂交法检测肿瘤中 VEGFmRNA<sup>[7]</sup> 含量，还有的学者测定血清中的 VEGF 含量。虽然研究方法各异，但多数都得出相同的结论，且与我们研究的结果相同，即 VEGF 在肿瘤中有高表达，说明 VEGF 与大肠癌的生长有关，VEGF 是由肿瘤细胞分泌的，VEGF 有促血管生成作用。抗血管生成的基因治疗已经成为抗肿瘤研究的新热点，杨治华<sup>[4]</sup>等人在应用具有中和活性的抗人 VEGF 单抗进行抑瘤动物实验时发现 VEGF 单抗能阻断小鼠自发乳腺癌组织血管的形成，显著抑制原发瘤的生长；

### 3.5 VEGF 蛋白表达与大肠癌分化程度有相关性

随着大肠癌分化程度降低，VEGF 表达增强，存在统计学意义( $P < 0.05$ )；但 Tanigawa 等对肾癌的研究中发现，高分化的癌组织 VEGF 表达强于低分化癌组织；Ferrara 等<sup>[5]</sup>报道 VEGF 在几乎所有的良恶性结肠肿瘤中均有表达。这种 VEGF 在不同组织类型中表达的差异可能与不同肿瘤的生物学特性及不同肿瘤组织的微环境有关。

### 3.6 VEGF 在大肠癌中表达与大肠癌病理分期的关系

从实验结果中，我们发现 VEGF 的表达与 Dukes 分期相关，A、B、C、D 期表达率分别为 36%、69%、87.5%、100%。A + B 与 C + D 期间存在显著性差异( $P < 0.01$ )。可见，随着 VEGF 表达水平的增高，发生淋巴结和远处转移的危险度显著增加。本研究表明 VEGF 作为高效的血管调控因子，在大肠癌血管形

成中发挥重要作用。Takahashi 等<sup>[8]</sup>在对结肠癌的研究中发现，癌浸润前微血管密度较高，新生血管化程度活跃，VEGF 表达也明显。Ellis 等<sup>[9]</sup>发现 VEGF 在结肠癌转移细胞株中的表达较无转移细胞株中高。这提示大肠癌 VEGF 表达与新生血管化部位的一致性及其与浸润转移的关系。所以 VEGF 与大肠癌 Dukes 分期密切相关，可以作为判断大肠癌 Dukes 分期，预测淋巴结和远处转移的指标。

### 3.7 TNF $\alpha$ 与 VEGF 在大肠癌中表达的相关性

本实验结果显示 TNF $\alpha$  在大肠癌早期表达明显增强，提示 TNF $\alpha$  具有抗肿瘤作用，而 VEGF 表达则相反。二者之间差异显著，呈明显负相关。

综上所述，TNF $\alpha$  与 VEGF 蛋白抗原在大肠癌中均有良好的表达，二者间有较好的相关性，并且与肿瘤的分化程度、Dukes 分期及预后有密切的关系，因此二者联合检测可作为判断大肠癌生物学行为的客观指标。

### 参考文献

- [1] 谷依学,李汉贤,王汉群,等. TNF $\alpha$  及血管内皮生长因子的表达与胃癌生物学行为的关系. 华中大学学报, 2005, (01):78 - 79
- [2] 刘智红,康楠. 血管内皮生长因子与消化道肿瘤. 包头医学院学报, 2004, (01):145 - 146
- [3] 王倩,陈晓理,刘力华. VEGF 及其受体家族与白血病. 中国厂矿医学, 2005, (01):96 - 97
- [4] 杨治华,张力,王晓燕,等. 血管内皮生长因子与实体瘤的关系研究, 中华微生物学和免疫学杂志, 1999;19(4):282 - 285
- [5] Ferrara N, Vincenti V, Johnson AC, et al. Expression of VEGF in carcinoma. Nature, 1996,380(6573),439 - 442
- [6] Volland S, Yuan F, Taraboletti G, et al. TNF $\alpha$  antigen expression in cancer tissue. Int J Cancer, 1994,56:698
- [7] Guidi AJ, Mustonen T, Vaisman N, et al. The expression of VEGFmRNA in carcinoma. Cancer, 1996,78(3):454 - 60
- [8] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer[J]. Cancer Res, 1995,55:3964
- [9] Ellis LM, Liu W. vascular endothelial growth factor Expression and alternate splicing in nonmetastatic human colon cancer lines[J]. Proc Am Assoc Cancer Res. 1995,36:88